

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siebert

Immunoelektrophoretische Antigenstudien an *Candida albicans* und *tropicalis*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Margarete Hirsch
aus Breslau

Marburg 1966

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siebert

Immunoelktrophoretische Antigenstudien an *Candida albicans* und *tropicalis*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Margarete Hirsch
aus Breslau

Marburg 1966

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg/Lahn am : 22.2.1966

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan : Prof. Dr. med. O.Braun-Falco

Referent : Prof. Dr. med. R.Siegert, Hygiene-Institut
der Universität Marburg/Lahn

Correferent: Dozent Dr. med. W.Schiff, Hygiene-Institut
der Universität Marburg/Lahn

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Material und Methoden</u>	
1. Hefestämme	2
2. Züchtung	2
3. Antigenherstellung	2
4. Antiseren	
a. Herstellung der Immunseren	3
b. Gewinnung von Gamma-Globulin	4
5. Elektrophorese im Agar-Gel	4
6. Immunoelektrophorese	5
C. <u>Ergebnisse</u>	
I. Agarelektrophorese	
a. Rohantigene	7
b. Wässrige Phasen der Phenol/Wasser- Extraktion	9
II. Immunoelektrophorese	
a. Rohantigene	
1. Homologe Antigene	11
2. Heterologe Antigene	13
b. Wässrige Phasen	15
c. Erhitzte Antigene	17
d. Konzentrierung der Antikörper	
1. durch Lyophilisierung	18
2. Isolierung der Gamma-Globuline	19
D. <u>Besprechung</u>	20
E. <u>Zusammenfassung</u>	24
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	25



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554417_0013

A. Einleitung

Die serologische Klassifizierung der beiden klinisch wichtigsten Hefen *Candida albicans* und *Candida tropicalis* bereitet Schwierigkeiten, da über ihren antigenen Aufbau keine einheitlichen Angaben vorliegen. Während einige Untersucher, z.B. ALMON und STOVALL (2), GORDON (8), KEMP und SOLOTOROVSKY (14) sowie SEELIGER (22) Antigengleichheit fanden, sprechen die Befunde anderer Autoren, z.B. BIGUET (3,4), HASENCLEVER (11,12), MARTIN (16), POSPISIL (20) und TSUCHIYA (28,29) für Antigendifferenzen. Diese widersprechenden Mitteilungen erklären sich vermutlich aus der nicht einheitlichen Aufbereitung des Materials und den unterschiedlichen serologischen Untersuchungen.

Für diese Erklärung spricht die Beobachtung, daß sich antigene Unterschiede zwischen beiden Hefen weder in der Zellwand noch im Zellinhalt mit der Komplementbindungsreaktion, der Zellagglutination oder der Absorption mit intakten Hefezellen feststellen lassen (SIEGERT, MÜLLER und PACHALY, 23). Sensibilisiert man jedoch mit den Phenolextrakten der Hefen Erythrozyten, so kann man durch Absorption von Immunsereen nachweisen, daß *Candida albicans* mindestens ein Antigen mehr als *Candida tropicalis* besitzt (MÜLLER, 18).

Da es sich bei diesen Extrakten aber um Antigengemische handelt, ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Antigene aus dem Zellinhalt und den Zellwänden beider Hefen, sowie die durch Phenol/Wasser-Extraktion nach WESTPHAL (31) gewonnenen Polysaccharide in der Agar- und Immunoelektrophorese aufzutrennen und durch Kaninchen-Antiseren zu lokalisieren.

B. Material und Methoden

1. Hefestämme

Die vom Centraalbureau voor Schimmelculturs in Delft überlassenen Hefestämme

Candida albicans CBS 256 (Robin) Berkhout und
Candida tropicalis CBS 94 (Castellani) Berkhout
lagen in der Glattform vor.

2. Züchtung

Die auf Sabouraud-Maltose-Agar (Difco) überimpften Hefestämme wuchsen in 48 Stunden bei 30°C zu einem dichten Zellrasen. Nach dieser Zeit wurden die Kulturplatten mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, die Zellsuspensionen zentrifugiert, und das Sediment noch dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

3. Antigenherstellung

Nach dem Auswaschen wurden die Zellen wieder in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und in einer etwa 25 Vol%-igen Suspension in der Vibrogen-Zellmühle der Firma Bühler, Tübingen, eine Stunde lang bei 3200 UpM mit Glaskugeln von 0,5 mm Durchmesser aufgeschlossen. Das dabei entstandene Homogenisat diente als Vollantigen.

Die Trennung des Zellinhalts von den Zellwänden erfolgte durch vorsichtiges Zentrifugieren (SIEGERT, MÜLLER und PACHALY, 23).

Beide Fraktionen wurden als Antigene verwendet. Als weitere Antigene dienten von beiden Hefen Homogenisat, Zellinhalt und die wässrigen Phasen der Zellwände, die im Wasserbad auf 60°C bzw. 100°C erhitzt wurden.

Es stellte sich im Verlaufe der Untersuchungen heraus, daß sich die Anwesenheit von Kochsalz ungünstig auf die elektrophoretische Trennung der Antigene auswirkt. Deshalb wurden Homogenisat, Inhalt- und Zellwandantigen 48 Stunden gegen Leitungswasser, 24 Stunden gegen destil-

liertes Wasser und 12 Stunden gegen den benutzten Elektrophorese-Puffer dialysiert.

Eine Abwandlung der beschriebenen Antigenherstellung bestand darin, daß die Hefezellen, nachdem sie von der Sabouraud-Platte abgeschwemmt und das erste Mal zentrifugiert waren, mit destilliertem Wasser anstatt in Kochsalzlösung aufgenommen wurden. Dadurch entfiel das spätere Dialysieren.

Die Extraktion der serologisch aktiven Polysaccharide aus dem Zellinhalt und den Hefezellwänden erfolgte mit der Phenol/Wasser-Extraktion nach WESTPHAL (31). Abweichend von der Originalmethode wurden die gewonnenen wässrigen Phasen, ohne sie vorher gegen Wasser zu dialysieren, mit Carbowax eingeengt. Nach Fällung in Äthylalkohol unter Zusatz von Natrium-Acetat und dreimaligem Auswaschen wurde der Niederschlag in Wasser gelöst. Verwendet wurde eine Lösung, die pro ml etwa 30 mg der ausgefallenen Polysaccharide enthielt.

4. Antiseren

a. Herstellung der Immunsereen

Zur Immunisierung von je drei Kaninchen dienten das Homogenisat und die Zellwände beider Hefen, nicht erhitzt und erhitzt, sowie der nicht erhitzte Inhalt von *Candida albicans*.

Diese 9 Antigene wurden nach folgendem Schema intravenös injiziert: In der ersten Woche täglich ansteigende Dosen von 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 ml, in der zweiten und dritten Woche jeden zweiten Tag 2,0 ml. Jedes Kaninchen bekam ein Gesamtvolumen von 19,0 ml der jeweiligen Antigensuspension. Auf Trockengewicht bezogen betrug die Gesamtmenge der zur Immunisierung benutzten Homogenisate 400 mg, der Zellwände 160 mg und des Zellinhaltes (*Candida albicans*) 240 mg.

Fünf Tage nach der letzten Injektion wurden Blutproben entnommen, und die Antikörpertiter mit der Komplementbindungs-Reaktion ermittelt. Lagen die Titer unter 1 : 160, so erfolgte eine Nachimmunisierung. Da bei

manchen Tieren trotzdem kein höherer Titer zu erzielen war, wurde deren Serum durch Lyophilisierung eingeengt und auf das Vierfache konzentriert.

Mit den wässrigen Phasen der Phenol/Wasser-Extraktion erfolgte keine Immunisierung, da die in ihnen enthaltenen Substanzen Hapten-Charakter haben (MÜLLER, SIEGERT und PACHALY, 17).

b. Gewinnung von Gamma-Globulin

Die Isolierung der Gamma-Globuline erfolgte nach der Methode von SOBER und PETERSON (24): Eine DEAE-Cellulose-Säule von 35 cm Länge und 2,5 cm Durchmesser wurde mit 0,01 M Phosphatpuffer von pH 7,6 äquilibriert. Die Elution des in einem Volumen von 20 ml auf die Säule aufgetragenen Antiserums erfolgte mit etwa 50 ml Puffer. Die im UV-Spektrophotometer (Firma LKB - Schweden) bei 280 m μ registrierte Gamma-Globulin-Fraktion wurde aufgefangen, mit Carbowax eingeengt, gegen Aqua dest dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die Trockensubstanz ließ sich bis zu einer Konzentration von 5 % lösen.

5. Elektrophorese im Agar-Gel

Zunächst erfolgte die Auftrennung der Antigene mit Hilfe der Agarelektrophorese, wie von GORDON (7) und URIEL (30) angegeben. Die hierzu notwendige Apparatur sowie alle Zusatzgeräte stammten von der Firma LKB, Schweden.

Als Puffer diente der von Michaelis angegebene Diäthylbarbitursäurepuffer, Ionenstärke 0,1. Er enthielt 6,40g Natrium-Acetat und 9,81 g diäthylbarbitursaures Natrium, gelöst in 1000 ml Aqua dest., und war mit 1 n HCl auf pH 8,2 eingestellt.

Vergleichsweise wurde ein zweiter Puffer vom pH 8,6 verwendet, der folgende Zusammensetzung hatte: 15,50 g Natrium-Veronal, 2,76 g Veronal und 10,20 g Natrium-Acetat, gelöst in 1500 ml Aqua dest.

Für den benötigten 1,2 %-igen Agar wurden 1,2 g "Difco" Agar Special-Noble in 100 ml des mit Wasser 1 : 2 verdünnten Puffers im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Erstarren des Agar auf den Objektträgern wurde ein etwa 5 mm langer Graben durch Aufsaugen mit einem Filtrierpapierstreifen senkrecht zur Wanderungsrichtung ausgehoben. In diesen wurden folgende Antigene aufgetragen: Homogenisat, Zellinhalt und -wände, sowie die serologisch aktiven Polysaccharide, die durch Phenol/Wasser-Extraktion aus Inhalt und Zellwänden beider Hefen gewonnen worden waren.

In die Elektrodengefäße kam einer der oben beschriebenen Puffer. Bei 250 Volt (10 Volt/cm) erwies sich nach einigen Vorversuchen die Elektrophoresedauer von 1 Stunde am zweckmäßigsten. Danach kamen die Objektträger in ein Fixierbad von Methanol, Eisessig und Wasser im Verhältnis 9 : 1 : 5 und blieben dort 5 - 10 Stunden. Nach Lufttrocknung der Agarschicht erfolgte die Färbung.

Zur Auffindung unterschiedlicher chemischer Substanzen wurden Spezialfärbungen angewandt: Für Proteine eine 0,5 %-ige Amidoschwarz 10 B (Merck) - Lösung in Methanol-Eisessig im Verhältnis 9 : 1 ; anschließend Entfärben mit dem gleichen Methanol-Eisessig-Gemisch. - Für Polysaccharide die PAS-Färbung mit einer 1 %-igen Perjodsäure-Lösung und 1 %-igem Schiff'schem Reagens.

Zum Nachweis noch vorhandener Lipoproteine mußten die Objektträger nach der Elektrophorese für 6 Stunden in ein Fixierbad anderer Zusammensetzung gebracht werden: Alkohol absol. 500 ml, 10 % Calcium Chlorid 20 ml, Essigsäure 20 ml, mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt (nach URIEL und SCHEIDEGGER , 30). Anschließend wurde mit einer 0,5 %-igen Oil Red O (Gurr) - Lösung 2 Stunden gefärbt und mit 50 %-igem Alkohol entfärbt.

6. Immunoelktrophorese

Die Immunoelktrophorese wurde in Anlehnung an GRABAR und WILLIAMS (9,10), modifiziert nach SCHEI-

DEGGER (21), in der LKB-Apparatur durchgeführt.

Puffer und Herstellung der Agarplatten entsprachen der Agarelektrophorese. Je ein Tropfen der Antigenlösungen, der gleichen, wie in Abschnitt 5 genannt, wurde mit einer Kapillare in die ausgestanzten Löcher aufgetragen. Um beide Hefen miteinander vergleichen zu können, wurden immer die entsprechenden Antigen-Aufbereitungen auf einem Objektträger gegenübergestellt: Über dem Graben *Candida albicans*, unter dem Graben *Candida tropicalis*. Nach einstündiger Elektrophorese bei 250 Volt und dem Auftragen des Immunserums war bis zur völligen Entwicklung der Präzipitationslinien in der feuchten Kammer, in Abhängigkeit von dem Titer der Seren, eine Zeit von 12 bis 24 Stunden nötig. Danach erfolgte 12-stündiges Wässern der Objektträger in physiologischer Kochsalzlösung, um das nicht gebundene Eiweiß zu entfernen, anschließend Trocknen an der Luft und Färbung mit Amidoschwarz.

C. Ergebnisse

I. Agarelektrophorese

a. Rohantigene

Die elektrophoretische Wanderung der Substanzen aus *Candida albicans* und *Candida tropicalis* wurde zunächst in der Agarelektrophorese geprüft. Bei Versuchen mit unterschiedlichen Laufzeiten zeigten sich die besten Ergebnisse nach einer Stunde bei 250 Volt. Zur Untersuchung kamen das Homogenisat, der Zellinhalt und die Zellwände beider Hefen.

Nach Auftragen der homogenisierten Zellen von *Candida albicans* und *tropicalis* trennten sich im elektrischen Feld bei beiden Hefen zwei Substanzgruppen voneinander. Nach der Fixierung im Methanol-Eisessig-Wasser-Gemisch waren auf der Seite der Kathode zwei Fraktionen im Gel sichtbar, die sich nach Färbung mit Amidoschwarz nicht mehr darstellten. Stattdessen färbte sich eine zur Anode gewanderte Substanz, bei der sich aber keine scharfe Auftrennung in einzelne Fraktionen erzielen ließ. Wurde die für Kohlenhydrate charakteristische Färbung mit Perjodsäure - Schiff'schem Reagens (PAS) gebraucht, so stellten sich die zur Kathode gewanderten Substanzen, die schon nach der Fixierung sichtbar gewesen waren, als zwei gut voneinander abgetrennte Fraktionen dar. Die langsamere zog sich bis zur Auftragstelle hin und gliederte sich nochmals unscharf in zwei weitere Fraktionen auf (Abb. 1a und 1b).

Mit Oel-Rot färbten sich nur die Agarränder um den Auftragschlitz herum an: Die in geringem Maße vorhandenen Lipide zeigten keine elektrophoretische Beweglichkeit.

Ein gleiches Bild fand sich bei der Elektrophorese des Inhalts beider Hefen. Hier waren die Anteile der mit Amidoschwarz und Oel-Rot färbbaren Substanzen jedoch wesentlich geringer und ließen sich nur in Spuren sichtbar machen. Der mit PAS darstellbare Anteil war in gleicher Stärke und Verteilung vorhanden wie bei dem vollständigen Homogenisat.



Abb. 1a Agarelektrophorese des Homogenisates von C.albicans
nach Färbung mit Amidoschwarz



Abb. 1b Agarelektrophorese des Homogenisates von C.albicans
nach Färbung mit Perjodsäure-Schiff'schem Reagens

Die Auftrennung der Hüllen, in Kochsalz- und wässriger Aufbereitung, hatte keinen Erfolg. Es konnten weder mit Amidoschwarz noch mit PAS Substanzen nachgewiesen werden. Die mit Oel-Rot gefärbten Anteile entsprachen denen des Homogenisates und wanderten ebenfalls nicht in der Elektrophorese.

b. Wässrige Phasen der Phenol/Wasser-Extraktion

Da sich bei den unbehandelten Antigenen keine unterschiedliche Auftrennung zwischen *Candida albicans* und *tropicalis* zeigte, wurde weiter untersucht, wie sich die serologisch aktiven Substanzen nach Phenol/Wasser-Extraktion in der Agarelektrophorese verhielten. Dabei zeigte sich, daß die wässrige Phase des Inhalts beider Hefen in drei zur Kathode wandernde Fraktionen aufgetrennt werden kann.

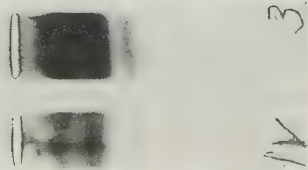


Abb. 2a Agarelektrophorese der wässrigen Phase des Zellinhaltes. Oben: *C. albicans*; unten: *C. tropicalis*

Wie aus Abbildung 2a hervorgeht, setzte sich die schnellste deutlich ab, während die beiden anderen nur schwer voneinander zu trennen waren. Nach PAS-Färbung

stellten sich entsprechende Fraktionen dar wie bei dem unbehandelten Zellinhalt und dem Homogenisat. Zwischen den wässrigen Phasen des Inhalts beider Hefen fand sich ebenfalls kein Unterschied. Die Ergebnisse der Amido-schwarz- und Oel-Rot-Färbung waren negativ.

Eine Gegenüberstellung von Wärme- und Kälteauszug der Phenol/Wasser-Extraktion ergab übereinstimmende Fraktionen. Deshalb wurde in weiteren Versuchen nur noch die Aufbereitung in der Wärme verwendet.

Im Gegensatz zu den unbehandelten Zellwänden, die sich nicht auftrennen ließen, zeigten ihre wässrigen Phasen nach Phenol/Wasser-Extraktion verschiedene Fraktionen.



Abb. 2b Agarelektrophorese der wässrigen Phase der Zellwände. Oben: *C.albicans*; unten *C.tropicalis*

Wie aus Abbildung 2b hervorgeht, besteht hier zwischen *Candida albicans* und *Candida tropicalis* ein nur geringer Unterschied: Während bei *Candida tropicalis* zwei Fraktionen nach PAS-Färbung auf der Seite der Kathode zu sehen sind, trennt sich *Candida albicans* nicht

so deutlich. Hier sieht man eine breite Bande, die über beide Tropicalisfraktionen reicht, deren Hauptbestandteil allerdings im Bereich der schnellsten Tropicalisfraktion liegt.

Vergleicht man die Auftrennung der Inhalt- und Zellwandsubstanzen miteinander, so fehlt bei letzterer die Fraktion mit der geringsten Wanderungsgeschwindigkeit.

Wie aus diesen Untersuchungen hervorgeht, lassen sich mit der Agarelektrophorese keine deutlichen Unterschiede zwischen *Candida albicans* und *tropicalis* darstellen. Die Homogenisate, der unbehandelte Zellinhalt und die wässrigen Phasen des Inhalts beider Hefen zeigen völlige Übereinstimmung. Lediglich die wässrigen Phasen der Zellwände lassen einen geringen Unterschied insofern erkennen, als sich der Zellwandextrakt von *Candida albicans* nicht sauber auftrennen läßt, während der von *Candida tropicalis* zwei getrennte Fraktionen ergibt.

II. Immunoелеktrophorese

a. Rohantigene

1. Homologe Antigene: Nachdem von der Agarelektrophorese bekannt war, daß sie eine Auftrennung in Substanzen ermöglicht, deren Affinität zu einzelnen Farbstoffen unterschiedlich ist, wurde die antigene Wirksamkeit der einzelnen Fraktionen auch in der Immunoелеktrophorese geprüft.

Beim Auftragen des Homogenisates beider Hefen und der Einwirkung eines Immunserums, das gegen dieses Homogenisat von *Candida albicans* gerichtet war, zeigten sich Präzipitationslinien auf der Kathoden- und der Anodenseite. Wie aus Abbildung 3a hervorgeht, besteht auf der Kathodenseite kein eindeutiger Unterschied zwischen *Candida albicans* und *Candida tropicalis*. Dagegen sind auf der Anodenseite deutliche Differenzen zwischen beiden Hefen zu erkennen: Bei *Candida tropicalis* fehlen neben der am weitesten zur Anode wandernden Fraktion noch weitere Linien in der Nähe des Auftragspunktes.

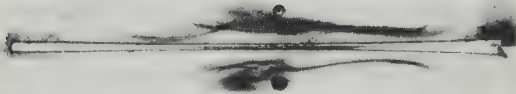


Abb. 3a Immunoelktrophorese des unerhitzten Homogenisats
über dem Graben : *Candida albicans*
unter dem Graben: *Candida tropicalis*
Immunserum gegen unerhitztes Homogenisat von *C.albicans*
(Kathode rechts)

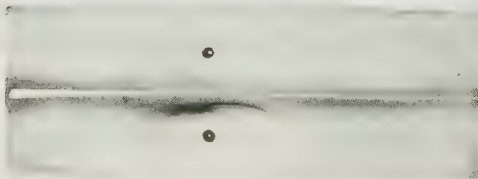


Abb. 3b Immunoelktrophorese des unerhitzten Homogenisats
über dem Graben : *Candida albicans*
unter dem Graben: *Candida tropicalis*
Immunserum gegen unerhitztes Homogenisat von *C.tropicalis*
(Kathode rechts)

Auch nach Anwendung eines Serums gegen das Homogenisat von *Candida tropicalis* stellten sich bei beiden Hefen unterschiedliche Präzipitate auf der Anodenseite dar. Die Abbildung 3b zeigt, daß mit dem Anti-Candidatropicalis-Serum und dem Homogenisat von *Candida tropicalis* Linien entstehen, die mit dem Homogenisat von *Candida albicans* nicht zur Entwicklung kommen.

Wie aus der Arbeit von SIEGERT, MÜLLER und PACHALY (23) zu ersehen ist, hat nur der nicht erhitzte Inhalt von *Candida albicans* die Fähigkeit, beim Kaninchen Antikörper zu induzieren. Das immunoelektrophoretische Diagramm dieses Serums mit den beiden Inhaltantigenen zeigte in der Hauptsache Präzipitate mit den zur Anode wandernden Bestandteilen beider Hefen. Auch hier sind Unterschiede zwischen *Candidaalbicans* und *Candida tropicalis* deutlich sichtbar. Eine antigene Wirksamkeit der positiv geladenen Inhaltstoffe schien nicht vorzuliegen. Die Präzipitationsbögen auf der Anodenseite der Auftragstelle, die völlig denen des Homogenisates entsprachen, ließen sich mit Amidoschwarz, nicht dagegen mit PAS anfärben. Bei Präparationen mit anderen Antigenen und Antiseren konnte nachgewiesen werden, daß auch nach der Präzipitation die Antigene auf der Seite der Kathode sich noch mit PAS anfärben ließen.

Wie in der Agarelektrophorese, so zeigten die unbehandelten Zellwände beider Hefen auch in der Immunoelktrophorese keine Wanderung. Selbst mit Seren, die in der Komplementbindungsreaktion die höchsten Titer (1 : 1280) hatten, bildeten sich keine Präzipitationslinien.

Mit Oel-Rot ließen sich die Immunoelktrophoresepräparate nicht anfärben.

2. Heterologe Antigene: Wenn das gegen den Inhalt von *Candida albicans* gerichtete Immunserum gegen die beiden Homogenisate diffundierte, so bildeten sich, ebenso wie vorher gegen den Inhalt, nur Präzipitate mit den zur Anode wandernden Bestandteilen. Auch hier trat wieder die am weitesten zur Anode wandernde Fraktion nur bei *Candida albicans* auf.

Im Gegensatz dazu führten, wie aus Abbildung 4 hervorgeht, die Anti-Zellwand-Seren mit den Homogenisaten zu Präzipitatlinien nicht auf der Anoden- sondern nur auf der Kathodenseite der Gelschicht.

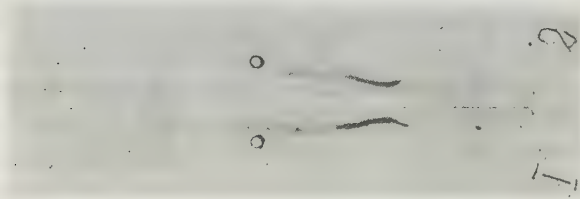


Abb. 4 Immunelektrophorese mit unerhitztem Homogenisat
über dem Graben : *Candida albicans*
unter dem Graben: *Candida tropicalis*
Immunserum gegen *Candida albicans* - Zellwände
(Kathode rechts)

Hier besitzen also alle zum negativen Pol wandernden Fraktionen der Agarelektrophorese antigenen Charakter. Mit dem schnellen Anteil bildete sich ein deutlicher Bogen, während sich die Fraktionen, die sich in der Agarelektrophorese als breites Band bis zur Auftragstelle hinzogen, auch in der Immunelektrophorese nicht voneinander absetzten und keine getrennten Präzipitate bildeten, sondern als langgestreckte Linie bis zum Ausgangspunkt reichten.

Auch bei den Inhaltantigenen erfaßten die Zellwand-Immunseren nur die zur Kathode wandernden Bestandteile , wobei sich aber hier bei *Candida albicans* und *Candida tropicalis* völlig übereinstimmende Bilder ergaben.

Die unbehandelten Zellwände wurden auch mit Antiserum gegen Homogenisat oder Inhalt nicht präzipitiert.

Homogenisat- und Inhalt-Antigene zeigten in der Immunoelktrophorese ein völlig übereinstimmendes Verhalten. Die Zellwände trennten sich unter den gegebenen Bedingungen in keinem Falle auf. Mit Antiseren gegen die Homogenisate beider Hefen fanden sich bei Homogenisaten und Inhalt Präzipitate auf beiden Seiten des Auftragspunktes. Während sich die Fraktionen beider Hefen auf der Kathodenseite nicht unterschieden, bestanden auf der Anodenseite zwischen *Candida albicans* und *Candida tropicalis* deutliche Differenzen. Das Anti-*Candida albicans*-Inhalt-Serum präzipitierte allein die Fraktionen auf der Anodenseite, während die Anti-Zellwand-Seren beider Hefen nur die positiv geladenen Substanzen der Kathodenseite präzipitierten.

b. Wässrige Phasen

Wie in der Agarelektrophorese, so wanderten auch in der Immunoelktrophorese keine Fraktionen der wässrigen Phasen der Phenol/Wasser-Extraktion zur Anode. Die Antiseren, die mit unbehandeltem Homogenisat oder Zellinhalt zu einer Präzipitationslinie nach der Anodenseite geführt hatten, zeigten mit den wässrigen Phasen nur noch Präzipitationslinien auf der Kathodenseite.

Die wässrige Phase des Inhalts trennte sich nur andeutungsweise auf. Es zeigte nur die in der Agarelektrophorese am schnellsten gewanderte Fraktion einen gleichmäßig abgesetzten Bogen, der dann in eine langgezogene Linie überging, die sich aus den kaum getrennten Fraktionen zusammensetzte (Abbildung 5, oberer Objektträger). Dieses Bild wiederholte sich mit allen Homogenisat- und Zellwand-Seren in übereinstimmender Weise. Dagegen zeigte das Antiserum gegen den Zellinhalt von *Candida albicans* keine Präzipitationslinien.

Bei Auftrennung der wässrigen Phase der Zellwände bildeten sich mit den Immunseren, die gegen die Homogenisate und die Zellwände gerichtet waren, zwei voneinander

getrennte Präzipitationslinien mit einer bis zur Auftragstelle gestreckten Linie, die den beiden Fraktionen der Agarelektrophorese entsprechen (Abbildung 5, unterer Objektträger).

Vergleicht man die Diagramme der Immunelektrophorese der wässrigen Phasen nach Phenol/Wasser-Extraktion von Zellwänden und -inhalt beider Hefen, so zeigt sich, daß sie im wesentlichen miteinander übereinstimmen.

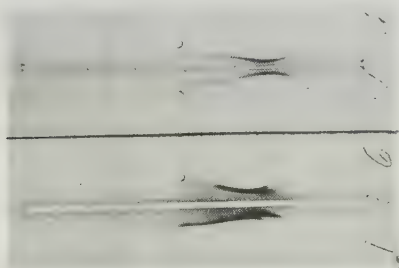


Abb. 5 Oberer Objektträger:

Immunelektrophorese der durch Phenol/Wasser-Extraktion gewonnenen wässrigen Phase aus dem Zellinhalt.

über dem Graben : *Candida albicans*

unter dem Graben: *Candida tropicalis*

Immunserum gegen unerhitztes Homogenisat von *C.albicans*

Unterer Objektträger:

Immunelektrophorese mit der wässrigen Phase der Zellwände.

Antigene und Immunserum wie oben.

(Kathode jeweils rechts)

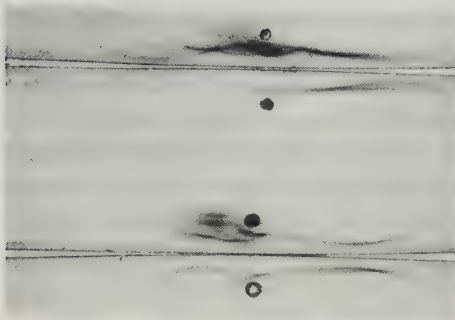


Abb. 6 Oberer Objektträger:

Immunoelektrophorese des Homogenisates Candida albicans
über dem Graben : unerhitzt

unter dem Graben: erhitzt auf 60°C

Immunserum gegen Homogenisat Candida albicans unerhitzt

Unterer Objektträger:

Immunoelektrophorese des Homogenisates Candida tropicalis
über dem Graben : unerhitzt

unter dem Graben: erhitzt auf 60°C

Immunserum gegen Homogenisat Candida albicans unerhitzt
(Kathode jeweils rechts)

C. Erhitzte Antigene

Während man bei anderen Hefen thermolabile Antigene fand, z.B. bei *Candida krusei* und *Candida parakrusei*, wurden bei *Candida albicans* und *Candida tropicalis* bisher keine thermolabilen Faktoren beschrieben. Zur Prüfung der Hitzebeständigkeit wurden deshalb das Homogenisat, der Zellinhalt und die wässrigen Phasen der Zellwände auf 100°C sowie das Homogenisat und der Zellinhalt

auch auf 60°C erhitzt. Dabei zeigte sich, daß die zur Kathode wandernden Substanzen bei beiden Hefen einer Erhitzung auf 100°C standhielten. Die zur Anode wandernden Bestandteile waren dagegen denaturiert.

Die Erwärmung auf 60°C wirkte sich bei den negativ geladenen Substanzen unterschiedlich aus: Bei *Candida albicans* ist nur noch das am weitesten zur Anode wandernde Antigen und eines am Auftragspunkt nachweisbar. Auch bei *Candida tropicalis* sind einige Präzipitationslinien auf der Anodenseite nicht mehr zu sehen, jedoch ist bei dieser Hefe der noch vorhandene Anteil größer (Abbildung 6).

Gleiche Bilder entstanden, wenn der erhitzte Inhalt beider Hefen als Antigen aufgetragen wurde.

Reagierten unerhitztes Homogenisat oder Inhalt mit einem Immunserum, das gegen das auf 60°C erhitzte Homogenisat gerichtet war, so entstanden analoge Bilder. Auch hier fehlten die gleichen Präzipitationslinien auf der Anodenseite wie bei der Gegenüberstellung von erhitzten Antigenen mit Serum gegen nicht erhitztes Homogenisat (vgl. Abbildung 6).

d. Konzentrierung der Antikörper

1. durch Lyophilisierung

Antiseren, die in der Komplementbindungs-Reaktion einen Titer unter 1 : 80 aufwiesen, bewirkten nur schwache Diagramme in der Immunoelktrophorese. Es wurde der Versuch unternommen, die Linien durch Konzentrierung der Seren zu verstärken. Die Seren wurden deshalb lyophilisiert und in dem vierten Teil des Ausgangsvolumens aufgenommen. Nach dieser Einengung der Antiseren stellten sich aber im Vergleich zu den unkonzentrierten Seren keine weiteren Linien dar. Eine Ausnahme machte das Antiserum gegen den Inhalt von *Candida albicans*, bei dem sich jetzt auch Präzipitate mit den Kathodenfraktionen von Homogenisat und Inhalt, sowie mit den wässrigen Phasen von Inhalt- und Zellwandextrakten beider Hefen bildeten. Das

Inhalt-Serum enthielt also auch Antikörper gegen diese Bestandteile in allerdings so geringer Menge, daß sie erst bei Anreicherung eine sichtbare Reaktion ergaben.

2. Isolierung der Gamma-Globuline

Da das Auftragen der eingeengten lyophilisierten Antiseren wegen ihrer hohen Viskosität mit der Kapillare sehr schwierig war, wurden die Gamma-Globuline zur Anreicherung der Antikörper durch Säulenchromatographie isoliert. Das gereinigte Gamma-Globulin wurde in einer 5 %-igen Lösung eingesetzt. Hiermit ließen sich zwar wesentlich klarere Präzipitationsbilder herstellen, jedoch keine weiteren Unterschiede zu den Linien, die mit Vollserum erhalten waren, erbringen. Die Seren mit niedrigem Antikörpertiter ergaben deutliche, wenn auch zarte Präzipitate. Hier wurde wiederum der Befund bei dem Inhalt-Antiserum bestätigt, daß Antikörper gegen die positiv geladenen Komponenten in geringem Umfange vorhanden sind.

Um zu prüfen, ob die übrigen Fraktionen auch noch Antikörper gegen die beiden Hefen enthielten, wurden sie eluiert und in der Immunelektrophorese mit den verwendeten Antigenen geprüft. Bei einer Konzentration von 80 mg/ml waren keine Präzipitationslinien zu erhalten. Die Antikörper gegen *Candida albicans* und *Candida tropicalis* gehören also allein der Gamma-Globulin-Fraktion an.

Nach Anreicherung der Antikörper wurden entsprechende Präzipitationlinien mit Antiseren gegen das Homogenisat und die Zellwände beider Hefen wie bei den unbehandelten Seren gefunden. Jedoch waren die Präzipitationsbilder vor allem mit der Gamma-Globulin-Fraktion wesentlich klarer und deutlicher. Bei den Antiseren gegen den *Candida albicans*-Inhalt wurden erst nach Anreicherung Antikörper gegen die zur Kathode gewanderten Fraktionen sichtbar.

D. Besprechung

Die Agarelektrophorese führt zur Trennung zwei verschiedener Substanzgruppen: Die eine wandert zur Kathode, läßt sich in Fraktionen aufspalten und mit PAS anfärben. Die andere wandert zur Anode, zeigt keine Trennung in Fraktionen und wird durch Amidoschwarzfärbung sichtbar. Die Wanderungsrichtung und die Spezialfärbungen lassen darauf schließen, daß es sich bei den zur Kathode wandernden Fraktionen um Polysaccharide bzw. Glykoproteide, bei den zur Anode wandernden um eiweißhaltige Substanzen handelt. Die letztere Annahme wird bestätigt durch den Bericht BRUNNERS (5), der als Hauptbestandteil des Hefeprotoplasmas ein Phosphoproteid, das Zymocasein, angibt, von dem zu erwarten ist, daß es im elektrischen Feld zur Anode wandert.

Die Überprüfung der gefundenen Substanzgruppen mit der Immunoelktrophorese ergab, daß sie beide antigenen Charakter haben.

Dieser Befund steht im Widerspruch zu den Untersuchungen NEGRONIS (19), der die Polysaccharide für die alleinigen präzipitierenden und komplementbindenden Antigene hielt. Ebenso bezeichnete auch TOMCSIK (27) die Polysaccharide in dem von ihm hergestellten Hefegummi als alleinige Träger der Spezifität. Gleiches berichteten ELINOV und ZAIKINA (6) von Polysacchariden, die durch Auszug mit Beta-Naphthol gewonnen wurden, AKIBA (1), der eine Phenolextraktion gebrauchte und KITAMURA (15), der ein polysaccharidhaltiges Hauttest-Antigen aus einer Candida albicans-Suspension durch Anlegen einer elektrischer Spannung gewann. Ebenso lokalisierte der Arbeitskreis um THJØTTA (26) und JONSEN (13) das serologische Reaktionsvermögen der Hefen allein in den Polysacchariden. Zu gleichen Ergebnissen kamen auch SUMMERS und Mitarbeiter (25), die extrahiertes Mannan als Hauptträger der antigenen Wirkung ansprachen.

Diese Ergebnisse dürften mit der Art der Aufbereitung der Antigene in Zusammenhang stehen. So fanden auch MÜLLER, SIEGERT und PACHALY (17) bei der Prüfung der Phenolphase keine antigene bzw. haptene Wirksamkeit, da das Eiweiß durch das Phenol und die anschließende Alkoholfällung denaturiert wird. Bis jetzt wies nur BIGUET (4) mit Hilfe der Immunoelktrophorese antigen wirkende Eiweißfraktionen bei einigen Hefearten nach.

Durch die vorliegenden Untersuchungen mit getrenntem Zellmaterial konnte gezeigt werden, daß die Eiweißantigene nur im Zellinhalt, die Polysaccharid- bzw. Glykoproteidantigene aber sowohl im Zellinhalt als auch in der Zellwand enthalten sind.

Vergleichende Untersuchungen an *Candida albicans* und *Candida tropicalis* mit der Immunoelktrophorese ergaben, daß zwischen den Eiweißantigenen beider Hefen eindeutige Unterschiede bestehen. Neben gemeinsamen besitzt jede der beiden Candidaarten Eiweißantigene, die in der anderen Art nicht vorhanden sind. Wie weit sie für die jeweilige Art spezifisch sind, muß der Vergleich mit anderen Hefearten erweisen.

Differenzen zwischen den antigen wirkenden Polysaccharid-Bestandteilen beider Hefen wurden von TSUCHIYA (28,29) durch Absorption von *Candida*-Immunseren mit intakten Hefezellen und von MÜLLER (18) durch Absorption mit sensibilisierten Blutkörperchen im Hämagglutinationstest nachgewiesen.

Die Immunoelktrophorese der Inhalt-Polysaccharide zeigte dagegen völlige Übereinstimmung zwischen beiden Hefen und zwar sowohl bei Verwendung des unbehandelten Inhaltmaterials als auch bei den daraus durch Phenol/Wasser-Extraktion gewonnenen Polysacchariden.

Einen allerdings geringen Unterschied zeigten die aus den Zellwänden beider Hefen isolierten Polysaccharide in der Agarelektrophorese in dem Sinne, daß sich diejenigen aus *Candida albicans* nicht sauber auftrennen ließen, während die *Candida tropicalis*-Polysaccharide zwei getrennte

Fraktionen ergaben.

Dieses Verhalten stimmt mit BIGUETs (4) Ergebnissen überein, der nach photometrischer Auswertung für die Glycoproteide bei *Candida albicans* eine Kurve mit einem Gipfel und bei *Candida tropicalis* eine zweigipflige Kurve fand.

Das immunoelektrophoretische Diagramm der aus den Zellwänden beider Hefen extrahierten Polysaccharide zeigte jedoch, daß auch die Zellwände von *Candida albicans* nach entsprechender Aufbereitung zwei antigene Fraktionen hatten, die mit denen von *Candida tropicalis* völlig übereinstimmten.

Die mit anderen Methoden gefundenen Antigendifferenzen der Polysaccharide konnten also mit der Immunoелеktrophorese nicht bestätigt werden. Da die Polysaccharide elektrophoretisch nur schlecht wandern, ist es aber möglich daß die gefundenen Fraktionen aus mehreren Polysaccharidkomponenten bestehen, die zusätzlich ein spezifisches Antigen beinhalten.

Nach Erwärmen erwiesen sich die Polysaccharid- bzw. Glykoproteidantigene beider Hefen, sowie ein Teil der Eiweißantigene als thermostabil. Die anderen Eiweißantigene waren thermolabil. Diese Befunde werden bestätigt durch den Nachweis bzw. das Fehlen der Antikörperbildung bei Versuchstieren. Somit darf es als gesichert gelten, daß sowohl *Candida albicans* als auch *Candida tropicalis* neben thermostabilen auch thermolabile Eiweißantigene besitzen.

Thermolabile Antigene sind in keiner der bisher aufgestellten Antigenformeln berücksichtigt worden. Auch BIGUET (4), der als einziger bisher Eiweißantigene und tropicaliseigene Antigene nachwies, fand keine thermolabilen Faktoren.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse kann bestätigt werden, daß zwischen *Candida albicans* und *Candida tropicalis* antigene Differenzen vorhanden sind. Diese Feststellung stimmt nicht nur mit den Befunden BIGUETs (4)

sondern auch mit den Untersuchungen von TSUCHIYA (28) überein, der für *Candida albicans* sieben, für *Candida tropicalis* nur sechs Antigenkomponenten erfaßte. Bei POSPISIL (20) lautet die Antigenformel für *Candida albicans*: a,1,2,3,4, für *Candida tropicalis*: b,1,2,3,4. MARTIN (16) bezeichnete *Candida tropicalis* als Minusvariante von *Candida albicans* und HASENCLEVER fand innerhalb der Art *Candida albicans* zwei Gruppen, A und B (11), wobei die Gruppe A mit *Candida tropicalis* antigen- gleich, die Gruppe B antigendifferent sein soll (12).

Im Allgemeinen wurden die Untersuchungen, die zur Aufstellung von Antigenformeln führten, durch Absorption von *Candida*-Immunseren mit intakten Hefezellen durchgeführt. Da nach den vorliegenden Ergebnissen in der Zellwand nur Polysaccharid- bzw. Glykoproteidantigene enthalten sind, kann durch Absorption mit intakten Hefezellen nur eine Aussage über die oberflächlichen Polysaccharid- bzw. Glykoproteidantigene der Zellwand gemacht werden. Die Eiweißantigene des Zellinhaltes bleiben hierbei also unberücksichtigt. Andererseits zeigen die Erfahrungen, daß mit immunoelektrophoretischen Untersuchungen allein die Polysaccharid- bzw. Glykoproteidantigene nicht genügend differenziert werden können. Zur Durchführung einer exakten Antigenanalyse ist es deshalb erforderlich, beide Methoden miteinander zu kombinieren, oder besser, die einzelnen Antigene zu isolieren, um mit deren Antikörpern vergleichende Untersuchungen anzustellen.

Auf eine Numerierung der gefundenen Antigene wurde verzichtet, da sie durch die ungenügende elektrophoretische Auftrennung der Polysaccharide doch nicht vollständig wäre. Auch hierfür ist die Reindarstellung der Einzelantigene unerlässlich.

E. Zusammenfassung

Über die Antigenstrukturen der Candidaarten liegen widersprechende Befunde vor, die vermutlich methodische Gründe haben. Die Lokalisation der Antigene ist noch nicht geprüft worden. Es wurde deshalb das antigene Verhalten des in Zellwand und -inhalt getrennten Zellmaterials der beiden Hefen *Candida albicans* und *Candida tropicalis* mit Hilfe der Immunoelktrophorese untersucht.

Bei Zellhomogenisat und -inhalt trennten sich in der Agarelektrophorese Poly saccharide und Eiweiße voneinander, während die unbehandelten Zellwände keine Wanderung zeigten.

Alle in der Agarelektrophorese gefundenen Fraktionen hatten in der Immunoelktrophorese antigene Wirkung. Beide Hefen bildeten sowohl mit homologen als auch mit heterologen Immunseren völlig gleichartige Präzipitate im Bereich der Polysaccharide.

Deutliche Unterschiede zwischen *Candida albicans* und *Candida tropicalis* fanden sich dagegen bei den Linien mit den Eiweißfraktionen: Neben gemeinsamen Antigenen stellten sich auch Eiweißantigene dar, die in der anderen Hefeart nicht enthalten sind.

Nach Erwärmen auf 60°C ließen sich die Eiweißantigene außerdem in thermostabile und thermolabile Fraktionen differenzieren. Die Polysaccharide waren alle thermostabil.

Die mit der Phenol/Wasser-Extraktion gewonnenen Polysaccharide des Zellinhaltes verhielten sich wie die Substanzen des nicht aufbereiteten Zellmaterials. Die extrahierten Polysaccharide der Zellwände von *Candida albicans* ließen sich agarelektrophoretisch nicht so gut trennen wie die von *Candida tropicalis*, hatten aber in der Immunoelktrophorese wie *Candida tropicalis* zwei Präzipitationslinien, die mit denen der Polysaccharidfraktion des Zellinhaltes übereinstimmten.

Die Polysaccharid- bzw. Glykoproteidantigene sind im Zellinhalt und der Zellwand, die Eiweißantigene dagegen nur im Zellinhalt enthalten.

Eine Aufstellung von Antigenformeln ist erst nach Isolierung der Einzelantigene sinnvoll.

F. Literaturverzeichnis

1. AKIBA, T., K. IWATA a. S. INOUE :
Studies on the serologic diagnosis of Candidiasis.
Studies on Candidiasis in Japan - Research Committee
of Candidiasis, Education Ministry of Japan,
1961, 65-77
2. ALMON, L. a. W. D. STOVALL :
Serologic reaction of cultures of Monilia and
of some other yeastlike fungi.
J. Infect. Dis. 55 (1934) 12-25
3. BIGUET, J., R. HAVEZ, D. TRAN VAN KY et R. DEGAEY :
Etude électrophorétique, chromatographique et
immunologique des antigènes de Candida albicans -
Caracterisation de deux antigènes spécifiques.
Ann. Inst. Pasteur 100 (1961) 13-24
4. BIGUET, J., D. TRAN VAN KY et S. ANDRIEU :
Etude électrophoretique et immunochemique com-
parée des antigènes de quelques levures du genre
Candida.
Mycopathologia 17 (1962) 239-254
5. BRUNNER, R. :
IV. Kapitel: Eiweißstoffe
Die Hefen in der Wissenschaft - Verlag Hans Carl,
Nürnberg 1960, 386-402
6. ELINOV, N. P. und N. A. ZAIKINA :
Präzipitationsreaktion bei der serologischen
Diagnose der Moniliasis.
Z. mikrobiol. 30 (1959) 40-45
7. GORDON, A. H., B. KEIL a. K. SEBESTA :
Electrophoresis of proteins in agar-jelly.
Nature 164 (1949) 498-499

8. GORDON, M.A. :
Differentiation of yeasts by means of fluorescent antibody.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 97 (1958) 694-698
9. GRABAR, P. et C.A. WILLIAMS :
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin.
Biochim. biophysica acta 10 (1953) 193-194
10. GRABAR, P. et C.A. WILLIAMS :
Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques.
Biochim. biophysica acta 17 (1955) 64-74
11. HASENCLEVER, H.F. a. W.O. MITCHELL :
Antigenic studies of Candida. I. Observation of two antigenic groups in Candida albicans.
J. Bact. 82 (1961) 570-573
12. HASENCLEVER, H.F., W.O. MITCHELL a. J. LOEWE :
Antigenic studies of Candida. II. Antigenic relation of Candida albicans group A and group B to Candida stellatoidea and Candida tropicalis.
J. Bact. 82 (1961) 574-577
13. JONSEN, J. :
Serological studies in genus Candida.
Thesis Oslo 1955
14. KEMP, G. a. M. SOLOTOROVSKY :
Fluorescent antibody studies of pathogenesis in experimental Candida albicans infections of mice.
J. Immunol. 88 (1962) 777-781

15. KITAMURA, S. :
Study on the preparation of the antigen for
diagnostic intradermal reaction, obtained from
Candida albicans on electric dissolution.
Studies on Candidiasis in Japan - Research
Committee of Candidiasis, Education Ministry
of Japan, 1961, 78-83
16. MARTIN, D.S. zit. nach SEELIGER, H.P.R. (22)
17. MÜLLER, H.L., R. SIEGERT u. D. PACHALY :
Zur Antigenstruktur von *Candida albicans* und
tropicalis. 2. Mitteilung: Serologisches Ver-
halten von Zellmembran und Zellinhalt nach
Phenol/Wasser-Extraktion.
Zbl. Bakt. I Orig. 193 (1964) 117-122
18. MÜLLER, H.L. :
Immunologische Differenzierung von *Candida*
albicans und *tropicalis*.
Tagung der Österr. mikrobiol. Gesellschaft,
Graz, Sept. 1964
19. NEGRONI, D. zit. nach AKIBA, T. et al. (1)
20. POSPISIL, L. zit. nach TSUCHIYA, F. et al. (29)
21. SCHEIDEGGER, J.J. :
Une micro-méthode de l'immunoélectrophorese.
Internat. Arch. Allergy 7 (1955) 103-110
22. SEELIGER, H.P.R. :
Mycologische Serodagnostik
J.A. Barth - Verlag, Leipzig 1958

23. SIEGERT, R., H. L. MÜLLER u. D. PACHALY :
Zur Antigenstruktur von *Candida albicans* und
tropicalis. 1. Mitteilung: Antigene Eigenschaften
von Zellmembran und Zellinhalt.
Zbl. Bakt. I. Orig. 191 (1964) 533-542
24. SOBER, H. A. a. E. A. PETERSON :
Protein chromatography on ion exchange cellulose.
Fed. Proc. 17, (1958) 1116-1126
25. SUMMERS, D. F., A. P. GROLLMANN a. H. F. HASENCLEVER :
Polysaccharide antigens of *Candida* cell walls.
J. Immunol. 92 (1964) 491-499
26. THJØTTA, TH., J. JONSEN a. S. RASCH :
Antigen studies in fungi.
Act. path. microbiol. Scand. Suppl. XCIII,
(1952) 367-374
27. TOMCSEK, J. :
Über die Rolle des Hefegummis in der serologischen
Differenzierung einzelner Hefearten.
Zschr. Immunit.forsch. 66 (1930) 8-16
28. TSUCHIYA, F., Y. FUKAZAWA, F. MIYASAKI a. S. KAWAKITA :
Studies on the classification of the genus
Candida III (thermostable and thermolabile
antigens of the seven species of the genus
Candida).
Jap. J. Exper. Med. 25 (1955) 75-83
29. TSUCHIYA, F., Y. FUKAZAWA a. S. KAWAKITA :
Serological classification of the genus *Candida*.
Studies on Candidiasis in Japan - Research Committee
of Candidiasis, Education Ministry of Japan.
1961, 34-46

30. URIEL, J. et J.J. SCHEIDEGGER :
Electrophorèse en gélose et coloration des
constituants.
Bull. Soc. chim. biol. 37 (1955) 165-168
31. WESTPHAL, O., O. LÜDERITZ u. F. BISTER :
Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/
Wasser.
Zschr. Naturforsch. 76 (1952) 148-155

Herrn Professor Dr.med. R. SIEGERT, Direktor des Hygiene-Instituts der Universität Marburg/Lahn, danke ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes, sowie für die uneingeschränkte Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Gleichfalls bin ich Frau Dr.med. H.-L. MÜLLER wegen ihrer ständigen Hilfsbereitschaft und freundlichen Beratung bei der Durchführung der Versuche zu herzlichem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 6. Dezember 1940 wurde ich, Margarete Hirsch, als Tochter des Dipl. Ing. Helmut Hirsch und seiner Ehefrau Ida, geb. Herrmann, in Breslau geboren. Die Reifeprüfung legte ich am 3. März 1960 an dem Mädchengymnasium "Engelsburg" in Kassel ab. Im Sommer-Semester 1960 begann ich das Medizinstudium an der Universität Marburg. Dort bestand ich am 24. April 1961 das Vorphysikum und am 3. August 1962 das Physikum. Die ersten beiden klinischen Semester verbrachte ich an der Universität München, die letzten vier wieder an der Universität Marburg. Nach dem Sommer-Semester 1965 meldete ich mich zum Staats-examen und beendete es am 17. Februar 1966.

Meine akademischen Lehrer waren:

in Marburg die Herrn Professoren Dr. Beckmann, Behrendes, Braun-Falco, Buchholz, Bücher, Dimroth, Drawert, Exner, Gedigk, Hamm, Hartmann, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hornung, Jacob, Lang, Linneweh, du Mesnil de Rochemont, Neubauer, Niessing, Petry, Rohen, Schleyer, Schmid, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Straub, Streicher, Walcher, Würterle,

in München die Herrn Professoren und Dozenten Dr. Büngeler, Eder, Eyer, Karnbaum, Kiese, Knedel, Leibbrand, von Lanz, Marchionini, May, Oberniedermayr, Schwiegk, Zenker.

